

*Atti dell'Accademia Peloritana dei Pericolanti
Classe I di Scienze Fis. Mat. e Nat.
Vol. LXXXI-LXXXII, CIA0401010 (2003-04)
Adunanza del 29 aprile 2004*

STUDIO COMPARATIVO ^1H -MRS DI INDICI DI N-ACETILASPARTATO AI CENTRI SEMIOVALI UMANI

E. ROTONDO*, G. BRUSCHETTA, P. BRAMANTI, M. R. DI PASQUALE

(* socio ordinario)

ABSTRACT. Standard Inacs, Index of N-Acetyl-L-Aspartate At Centrum Semiovale obtained by ^1H -MRS, are compared to those of two Groups of volunteers. Group 1 was formed by 30 individuals (65-74 years old) with small cognition deficit probably due to early AD (Alzheimer's Disease). Mean INACS of Group 1 was lower than the standard (significance = 89,4%, $t = 1.64$). This suggest that INACS evaluation could help early AD diagnosis. Group 2 was formed by 15 individuals (45-59 years old) with structural damages due to outcomes of Transitory Ischemic Attacks (TIA) or Minor Strokes (MS). In spite of the evident neuronal/axonal degeneration, mean INACS of this Group do not show significative decrease. This could be interpreted on the basis of the presence in the glial cell of N-acetyl derivatives whose resonances overlap the N-acetyl-L-aspartate one masking its lack.

SOMMARIO. Valori Standard di INACS, Indice Individuale di N-Acetilaspato (NAA) Ai Centri Semiovali determinato mediante ^1H -MRS (^1H -MRS = Spettroscopia di Risonanza Magnetica in vivo), vengono paragonati a quelli di individui appartenenti a due Gruppi differenziati di volontari. Il primo costituito da 30 soggetti (65-74 anni) con leggero deficit cognitivo (evidenziato da MMSE ed ADAS-cog test) presumibilmente dovuto ad iniziale AD (Alzheimer's Disease); il secondo da 15 soggetti (45-59 anni) con danni strutturali causati da numerosi pregressi attacchi ischemici transitori. Il primo Gruppo mostra una diminuzione di INACS medio rispetto allo standard di pari età (significanza = 89,4 %, $t = 1.64$). Questo risultato suggerisce un possibile utilizzo degli INACS per la precoce diagnosi di AD. Il secondo Gruppo non evidenzia significativa variazione di INACS rispetto al relativo standard. I valori apparentemente normali potrebbero essere determinati da N-acetilglutammato ed altri derivati N-acetilici contenuti nelle cellule gliali sostitutive. Le risonanze metiliche di questi N-acetil-derivati sovrapponendosi a quella dello N-acetil-L-aspartato, possono nascondere il decremento di intensità conseguente la irreversibile degenerazione assonica e neuronica.

1. Introduzione

La possibilità di determinare, mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica in vivo (^1H -MRS), metaboliti cerebrali in modo assolutamente non invasivo apre prospettive che promettono importanti ricadute speculative e cliniche¹. Particolare interesse nell'ambito dei dosaggi spettroscopici suggeriti per questi metaboliti rivestono quelli relativi ad N-acetil-L-

aspartato, un amminoacido che ricopre molteplici importanti ruoli biochimici alcuni dei quali ancora insufficientemente definiti. Negli organismi dei mammiferi quantità rilevabili di N-acetil-L-aspartato sono presenti solo all'interno di neuroni ed assoni e pertanto questa sostanza può essere ritenuta un marcatore della loro vitalità²⁻⁴. Negli ultimi dieci anni notevoli sforzi sono stati finalizzati alla messa a punto di metodiche di analisi spettroscopica quantitativa assoluta in vivo di metaboliti cerebrali, ricorrendo a standard interni (valori assoluti del segnale dell'acqua) o esterni (campioni di concentrazione nota collocati all'interno della bobina)⁵. Suddette metodiche, nonostante la notevole potenzialità diagnostica di questi metaboliti, non sono praticamente mai entrate nell'uso clinico vuoi per le peculiari caratteristiche delle apparecchiature in dotazione (notevolmente difformi nei vari Centri), vuoi per i prolungati tempi di analisi che costringerebbero i pazienti a lunghe permanenze all'interno del magnete. Abbiamo pertanto ritenuto opportuno mettere a punto nel nostro Centro un metodo di quantificazione relativo che consentisse una determinazione di N-acetil-L-aspartato che fosse rapida e raffrontabile, con minima incidenza strumentale, ad analoghe condotte in altri Centri ¹H-MRS⁶. La notevole riproducibilità intraindividuale e la relativamente ristretta variabilità interindividuale degli indici di N-acetil-L-aspartato (INACS) da noi determinati con questa metodica hanno permesso di individuare intervalli standard di INACS, da noi definiti con l'acronimo ASIR = Age Sectorial INACS Range, che dovrebbero comprendere, in caso di normale distribuzione statistica, il 95% circa della popolazione sana. Caratteristica precipua degli INACS individuali è di essere la media di un gran numero di differenti risultati riferiti ad una estesa area cerebrale di composizione omogenea. Essi presentano cioè caratteristiche particolarmente idonee a rilevare degenerazioni neuronica ed assonica diffuse. Abbiamo quindi ritenuto opportuno iniziare un monitoraggio degli INACS esteso a soggetti potenzialmente affetti da degenerazioni cerebrali diffuse, allo scopo di confrontarli con i relativi valori standard. Nel presente lavoro vengono riportati risultati ed analisi comparative riferite agli standard di due Gruppi di volontari: a) soggetti con moderato deficit cognitivo; b) soggetti con numerosi pregressi attacchi ischemici transitori.

2. Risultati e Discussione

In accordo con il precedente protocollo, per la valutazione della concentrazione relativa di N-acetil-L-aspartato abbiamo usato la tecnica CSI (Chemical Shift Imaging) che prevede la eccitazione simultanea di un elevato numero di differenti volumi contigui all'interno di una sezione interassiale di materia cerebrale. Questa tecnica consente la contemporanea acquisizione di numerosi spettri NMR (tipicamente 64) focalizzati in altrettanti differenti distretti adiacenti di una sezione interassiale. La focalizzazione spaziale è ottenuta dalla fase degli spettri codificata da un apposito gradiente angolare. Il vantaggio della tecnica CSI è quello di acquisire in un tempo limitato un gran numero di differenti spettri NMR di aree cerebrali contigue con sensibilità e risoluzione paragonabili a quelle di tecniche a volume singolo. La quantificazione in ognuno dei distretti focalizzati è stata da noi espressa come rapporto tra le intensità dei picchi di NAA e Cre, usando di fatto il picco della creatina come standard di quantificazione interna relativa⁷. La valutazione della concentrazione di N-acetil-L-aspartato all'interno di tutta la sezione interassiale è attuata mediando il rapporto NAA/Cre tra tutti i 64 spettri teoricamente disponibili. Gli INACS da noi proposti come indici individuali di aspartato ai centri semiovali umani sono il risultato di queste medie⁶. Nel presente lavoro riportiamo una valutazione comparativa degli INACS standard con quelli di individui nei quali eventi patologici avessero potuto determinare una diminuita diffusa vitalità assonica e neuronica. Il primo Gruppo della nostra indagine ha compreso 30 volontari di età compresa tra 65 e 74 anni di cui si sospettava un iniziale AD sulla base di lievi deficit evidenziati dai test cognitivi MMSE (Mini Test Status Examination) ed ADAS-cog (Alzheimer Disease Assessment Scale). Le immagini tomografiche di questi pazienti non

evidenziavano alterazioni morfoanatomiche strutturali. La media interindividuale dei valori di INACS per questo Gruppo é 1.77 ± 0.16 (Tab.1):

Tabella 1

INACS medi di 30 individui con lievi deficit cognitivi paragonati ai corrispondenti valori standard.

	Media interindividuale INACS
1) Pazienti con modesti deficit cognitivi (30 Volontari, 65-74 anni)	1.77 ± 0.16
2) Standard pari età (30 Volontari sani, 66-76 anni)	1.83 ± 0.12

P = 0.11 (livello di confidenza 89.4 %, t = 1.64 per 58 gradi di libertà)

L'analisi statistica comparativa delle medie INACS mostra che essa è più bassa di quella dei volontari sani di pari età. La probabilità P che le due serie di valori appartengano alla medesima distribuzione statistica è pari a 0.11 (significanza 89.4 %, t = 1.64 per 58 gradi di libertà). Il risultato suffraga il possibile utilizzo degli INACS come ausilio per diagnosi precoci di AD, in una fase in cui non vi siano ancora nelle immagini segni obiettivi di deterioramento strutturale. E' infatti molto probabile che le modificazioni chimiche rilevate dalla spettroscopia precedano le alterazioni morfoanatomiche evidenziabili dalle immagini. Il secondo Gruppo da noi prescelto per la valutazione comparativa ha compreso 15 soggetti tra i 45 ed i 59 anni d'età, che avessero presentato episodi di infarti cerebrali con sintomi transitori (attacchi ischemici transitori, TIA o minor stroke, MS) associati a danni strutturali comprovati dalle immagini. Il piano trasversale per l'acquisizione degli spettri NMR veniva focalizzato ai centri semiovali cercando di includere all'interno del volume prescelto il maggior numero di aree infartuate. Piuttosto sorprendentemente, alle evidenti degenerazioni morfoanatomiche mostrate delle immagini, non corrispondevano abbassamenti di INACS significativi (Tab. 2).

Tabella 2

INACS medi di 15 individui con danni strutturali dovuti a numerosi pregressi attacchi ischemici transitori.

	Media interindividuale INACS
--	---

1) Pazienti polinfartuati (15 individui, 45-59 anni)	1.85 ± 0.12
2) Volontari sani di pari età (24 individui, 45-58 anni)	1.87 ± 0.11

In seguito ad infarti cerebrali i neuroni e gli assoni danneggiati vengono in breve tempo sostituiti da cellule gliali. In queste cellule non è presente N-acetil-L-aspartato, mentre continua ad essere presente Cre in percentuale simile a quella di neuroni ed assoni. I valori apparentemente normali di INACS per questi soggetti potrebbero essere dovuti ad N-acetilglutammato o altri N-acetil-derivati presenti nella glia. Le risonanze acetiliche di tutti questi composti praticamente coincidono. Il picco di intensità simile a quello delle aree integre potrebbe essere dovuto alla sovrapposizione delle risonanze N-acetiliche della glia che mascherano il decremento di N-acetyl-L-aspartato determinato dalla degenerazione neuronica. In accordo con la nostra ipotesi è stato riportato che in seguito a episodi di infarto cerebrale acuto, dopo un iniziale decremento, si può verificare un ripristino dell'intensità del picco di NAA, quando le cellule gliali abbiano completamente sostituito neuroni ed assoni degenerati⁸.

3. Parte Sperimentale

Le misure sono state eseguite su un'apparecchiatura Siemens 63 Vision Magnetom "whole body" 1.5 T (proton frequency 63,9 MHz) con gradienti attivamente schermati di 10mT/m. Per le misure spettroscopiche (¹H-MRS) così come per la raccolta delle immagini (MR) è stata utilizzata la medesima bobina circolare polarizzata di diametro pari a 28 cm. Informato consenso alla esecuzione dell'indagine spettroscopica è stato rilasciato per ogni analisi dai pazienti e dai familiari accompagnatori.

Il posizionamento e la selezione delle sezioni di materia cerebrale da sottoporre ad analisi è stato realizzato su tre piani di acquisizione mediante immagini gradient-eco (Fig.1). Le immagini definitive, utilizzate come base per la successiva analisi spettroscopica, sono state raccolte mediante la sequenza di turbo spin eco localizer-tse15-tra (Fig. 2). Le mappe spettrali CSI-135 sono state sovrapposte ad una delle immagini interassiali di turbo spin eco localizzata sopra il corpo calloso a livello dei centri semiovali (Fig. 3). I dati spettrali sono stati raccolti nel dominio del tempo utilizzando una sequenza CSI-135 standard con tempi di spin eco (TE) di 135 ms e un tempo di ripetizione (TR) di 1500 ms. La soppressione del segnale dell'acqua è stata ottenuta mediante tre preliminari impulsi di radiofrequenza (RF) selettivi (CHESS)⁹. Gli spettri CSI-135 su due dimensioni sono stati acquisiti usando 16x16 stadi di codificazione angolare. Altri importanti parametri di acquisizione: FOV = 16x16 cm²; VOI = 8x8 cm² (nel piano interassiale XY) x 2 cm (nel piano longitudinale Z); Volume nominale dei cubi di materia cerebrale sondati 2 cm³. Numero di Transienti, NA = 2; Tempo di Acquisizione, AQ = 12,8 minuti.

I dati sono stati processati dal software in dotazione Siemens Numaris con i seguenti parametri. Zero filling dei 2048 dati di acquisizione per un totale di 4096. Filtro Gaussiano (centro 0, metà larghezza 317ms); trasformata di Fourier e correzione manuale della fase. Gli spettri caratterizzati da una eccessiva distorsione della linea di base o da una cattiva risoluzione, venivano eliminati; ciò ha determinato l'esclusione dalla matrice spettrale di un numero di spettri che va da un minimo di 10 ad un massimo di 22. La gran parte degli spettri eliminati era localizzata sulla cornice esterna del VOI, dove la minor sensibilità della bobina,

unitamente ad una minore omogeneità del campo dovuta alla vicinanza delle ossa craniche, causava importanti distorsioni dell' omogeneità del campo magnetico.

I dati sono anche stati processati con una stazione grafica della Bruker O2 Silicon Graphic. I risultati delle due procedure risultano in buon accordo.

Per altri dettagli operativi, così come per una dettagliata descrizione delle procedure di calcolo utilizzate per la valutazione di INACS, si rimanda al lavoro precedente⁶.

Analisi Statistica dei dati

La probabilità P di eguali distribuzioni statistiche fra i risultati dei due Gruppi (null hypothesis) veniva calcolata sulla base di comparazioni di medie con varianza non nota (test di Student)¹⁰.

BIBLIOGRAFIA

1. PRICHARD JW. MRS of the brain - prospects for clinical application. Spectroscopy, IR Young and HC Charles. MR. Ed. Martin Lunitz Ltd, Londra 1996, 1-23.
2. BIRKEN DL, OLDENDORF WH. N-acetyl-aspartic acid: a literature review of a compound prominent in ¹H-NMR spectroscopic studies of brain. *Neurosci Behav Rev* 1989, 13, 23-31.
3. ROSS B, MICHAELIS T. Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q* 1994, 10, 191-247.
4. a) MILLER B L. A review of chemical issues in 1H-NMR spectroscopy: N-Acetyl-L- Aspartate, Creatine and Choline. N.M.R. in Biomedicine. 1991, 4, 47-52; b) Nadler JV, Cooper JR. N-Acetyl-L- Aspartic acid content of human neural tumours and bovin peripheral nervous tissues. *J Neurochem* 1972, 19, 213-319.
5. a) KREIS R, ERNST T, ROSS BD. Absolute quantitation of water and metabolites in the human brain. II. Metabolite concentration. *J Magn Res, Series B*. 1993, 102, 9-19; b) MICHAELIS T, MERBOLDT KD, BRUHN H, HANICKE W, FRAHM J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectra. *Radiology* 1993, 187, 219-227; c) PFEFFERBAUM A, SULLIVAN EV, ADALSTEINSSON E, SPIELMAN D, LIM KO. In vivo quantification of N-acetylaspartate, creatine, and choline from large volumes of gray and white matter on magnetic resonance spectroscopy imaging: application to normal aging. *Magn Res Med* 1999, 41, 276-294.
6. ROTONDO E, BRUSCHETTA G, SACCÀ A, BRAMANTI P, DI PASQUALE MR. Straightforward relative quantitation and age-related human standards of N-acetylaspartate at the centrum semiovale level by CSI ¹H-MRS. *Magn Res Im* 2003, 21, 1055-1060.
7. a) TEDESCHI G, BERTOLINO A, LUNDBOM N, BONAVITA S, PATRONAS NJ, DUYN JH, METMAN LV, CHASE TN, DI CHIRO G. Cortical and subcortical chemical pathology in Alzheimer's disease as assessed by multislice proton magnetic resonance spectroscopy imaging. *Neurology* 1996, 47: 696-704; b) MARSHALL L, WARDLAW J., CANNON J, SLATTERY J AND SELLAR RJ, Reproducibility of metabolite peak areas in 1H MRS of brain, *Magn Res Im*, 1996, 14: 3, 2281-292.
8. GIDEON P, SPERLING B, ALLIEN-SOBORG P, OLSEN TS, HENRIKSON O, Long follow up of cerebral infarction patients with proton magnetic resonance spectroscopy, *Stroke*, 1994, 25:5, 867-973.
9. POWLES PJW, FRAHM J., Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS, *Magn Reson Med*, 1998, 39, 53-60.
10. BARLOW RJ., Statistics: a guide to the use of statistical methods in the physical sciences, *John Wiley and Sons*, New York 1989, 157-159.

E. ROTONDO AND G. BRUSCHETTA

Dipartimento di Chimica Inorganica, Chimica Fisica e Chimica Analitica

Facoltà di Scienze dell'Università di Messina, Salita Sperone 31, Italy;

P. BRAMANTI

Centro Studi Neurolesi, Facoltà di Medicina, Università di Messina, Italy

M. R. DI PASQUALE

Azienda Ospedale Piemonte, Via Spadafora 43, Messina, Italy.

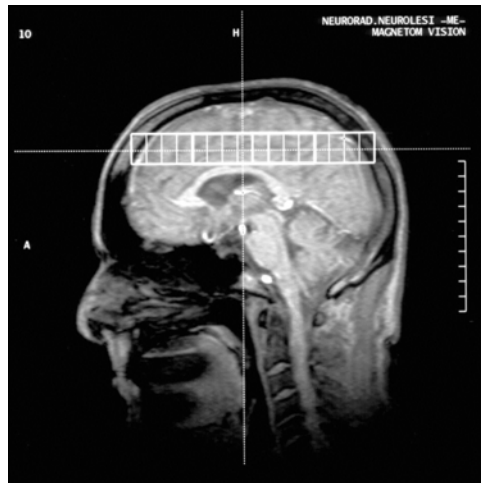


FIG. 1:
Veduta sagittale di
sezione di area
cerebrale (marcata
l'area deputata
all'analisi).

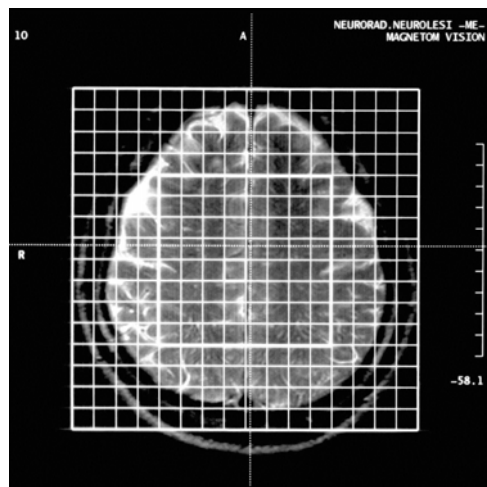


FIG. 2:
Veduta trasversale
della sezione
utilizzata come
base per le
immagini.

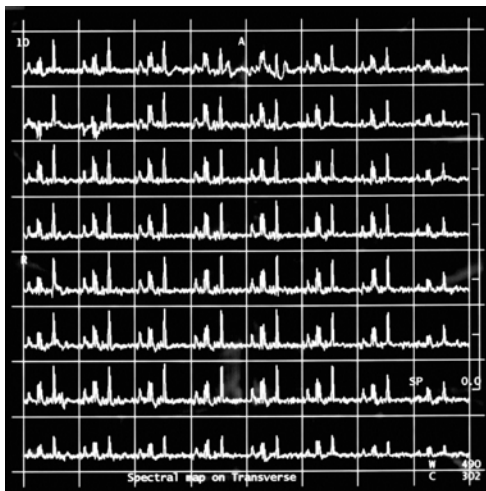


FIG. 3a):
Mappa degli spettri
 ^1H -NMR acquisita
mediante CSI-135
sovrapposta alla
immagine
trasversale di base

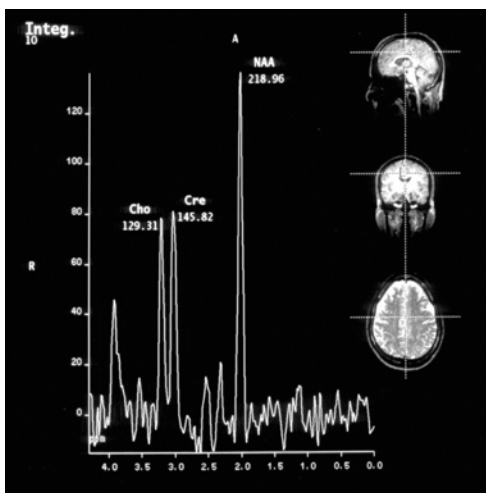


FIG. 3b):
Particolare della
mappa spettrale.